

MİKROBİYOLOJİDE DEĞİŞEN KAVRAMLAR VE YANSIMALARI

Gülden ÇELİK

Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İSTANBUL
gulden.yilmaz@yeditepe.edu.tr

ÖZET

Günümüzde yeni kavramlar sağlık alanında gelişen teknolojiyle birlikte gündeme gelmektedir. Omik'ler, sentetik biyoloji, XNA'lar, ekzosomlar, sistemler biyolojisi ve P6 tıbbi gibi bu yeni kavramların özellikle infeksiyon hastalıklarından korunma ve tedavisinde giderek artan yansımalarının boyutu büyük olacaktır.

Anahtar sözcükler: ekzosom, omikler, P6 tıbbi, sentetik biyoloji, sentetik genetik, sistemler biyolojisi, XNA

SUMMARY

New Concepts in Microbiology and Their Projections

Today many new concepts with the evolving technology has come into debate in healthcare. Projections of these insight such as omics, synthetic biology, XNA, exosomes, systems biology and P6 medicine seem to have great dimension in prevention and treatment of infectious diseases.

Keywords: exosomes, omics, P6 medicine synthetic biology, synthetic genetic, systems biology, XNA

Günümüzde sağlık alanında hızla değişen ve gelişen kavramlara paralel olarak mikrobiyolojiye de yansımalar olmaktadır. Teknolojik ilerlemeler, küresel sağlığı geliştirmeye büyük katkıda bulunmaktadır. Teknoloji bunu sadece ilaç, aşı ve tıbbi cihazlarla değil aynı zamanda daha iyi sağlık koşulları ve tarımda ilerlemeler ile sağlayabilmektedir. Günümüz şartlarında gerçekçi olmak gerekirse sağlık teknolojisi bugün için sadece bunu maddi olarak karşılayabilenlerin hizmetine odaklanmış durumdadır. Özellikle dünyadaki en fakir ülkelerin gereksinimlerine yönelik daha tutumlu teknolojilerin geliştirilmesi gündeme gelmektedir. Teknoloji tek başına yeterli değildir. En yüksek etkisini gösterebilmesi için süreçteki yeniliklerle de birleşmelidir. Yüksek gelirli ülkelerde sağlık hizmeti sunumu, büyük ölçüde teknolojiye bağımlı bulunmaktadır. Oysa yeni teknolojilere ve tedavilere dünyanın fakir insanları erişememektedir. Düşük ve orta gelirli ülke insanları sağlık için teknolojiden çok az yararlanabilmektedir. Örneğin İngiltere'de antiretroviral tedaviye gereksinimi olanlar ona ulaşırken, Kongo Demokratik Cumhuriyeti'nde hastaların sadece % 14'ü bu tedaviden yararlanabilmektedir.

Teknolojinin, küresel sağlık gereksinimlerine katkısının tayini çok kolay değildir. Kanıtlar, yüksek gelirli ülkelerde sağlık teknolojisinin yararlarını göstermektedir ancak tüm dünyada az ve orta gelirli ülkelerde bu konuda veri yoktur. Oysa 1999 Dünya Sağlık Raporu'nda 1952-1992 yılları arasında sağlıktaki kazanımların yarısının teknolojiye daha iyi ulaşmadan kaynaklandığını gösterilmektedir. Etkili HIV tedavisi 1996 yılında mümkün hale gelmiştir. HAART ile AIDS gelişimi geciktirilmiştir ve dört yıl içinde yüksek gelirli ülkelerde HIV/AIDS'ten ölüm çok yüksek oranda azalmış bulunmaktadır. Bu tedaviye yüksek oranda erişemeyenler için düşük maliyetli, basit tedavilerin geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır. Tüberküloz tanısında en sık kullanılan balgam mikroskopisi ortalamada olguların yarısını atladığı için 2006 yılında yapılan bir çalışmada basit hızlı ve duyarlı bir laboratuvar testinin yılda 400,000 kişinin hayatını kurtaracağını gösterilmiştir. 2010 yılında DSÖ desteği ile tamamen otomatize, iki saat içinde duyarlı ve özgül sonuç veren, bakterinin aynı zamanda ilk tedavi seçeneği olan rifampisine duyarlılık sonucunu da

sağlayan 'Xpert MTB/RIF tanı testi' geliştirilmiştir. Ancak, bu test az gelirli ülkeler için, 17,000 dolarlık cihazı ve 14 dolarlık kartuşu ile, hasta tanısına çok yaklaşmışken, tam bir hasta başı test özelliğini yerine getirememiştir. Tüberküloz tanısında altyapı gerektirmeyen daha basit gerçek bir hasta başı teste büyük gereksinim sürmektedir. Teknoloji yüksek gelirli ülkelerdeki deneyimin kullanılabilmesini, uzak da olsa, kolaylaştırmalıdır. Tele-tıp ile, bilgi ve iletişim teknolojileri kullanılarak uzaktakilere sağlık hizmeti ulaştırılabilmektedir. Özellikle fakir ülkelerin problemlerine yönelik teknolojiler için yatırımlar çok düşük orandadır. Örneğin 1975-2004 yılları arasında malarya, tüberküloz, Chagas hastalığı, Schistosoma'lar ile oluşan hastalıklar için geliştirilen ilaçlar, yeni geliştirilen ilaçların % 1.4'ünü oluşturmaktadır. Antiretroviral tedaviyi izlemede kullanılan CD4 tayini için geliştirilen, parmak ucu kanında 10 dakikada, elektronik cihazsız ve ucuz sonuç sağlayan çalışma; yüksek gelirli ülkelerde kullanılan teknolojiyi ufak ve taşınabilir ucuz hale getirmeye çalışmak yerine, direkt az gelirli ülkelerin gereksinimi karşılayacak tutumlu teknoloji geliştirmek amacıyla az gelirli ülkelerin sağlık çalışanlarından bilgi alınarak, bir grup akademisyen ve özel sektör uzmanından oluşan bir grup tarafından geliştirilmiştir. Bu CD4 girişimi örnek alınmalıdır⁽⁶⁾.

Son 20 yıldaki olağanüstü ilerlemelere rağmen infeksiyon hastalıkları her yıl milyonlarca kişinin ölümüne yol açmakta, yeni ve tehlikeli infeksiyonlar ortaya çıkmakta ya da yeniden önem kazanmaktadır. Bu durum devamlı sürveyansı, duyarlı hızlı tanıyı, yeni aşı ve tedavi için ilaç geliştirmeyi ve devamlı araştırmayı gerekli kılmaktadır. Ancak son 20 yıllık tecrübe bu konuda kaydedilen ilerlemelerin son derece umut vaat edici olduğunu göstermektedir. Genomik ve proteomik çalışmaları tanı, önlem ve tedaviyi kolaylaştırmıştır. 1992 yılından bu yana yüksek verimli genetik teknikler binlerce mikroorganizmanın, vektörlerinin ve konaklarının genomlarının dizi analizlerinin yapılmasını sağlamıştır. Ayrıca bu çalışmalar yeni etkenlerin ve patogenezinin belirlenmesini sağlayarak sürveyans, tanı, ilaç ve aşı çalışmalarına katkıda bulunmuştur. PCR gibi genomik teknikler mik-

roorganizmalar arasındaki daha önce hayal edilemeyecek düzeyde farklılık olduğunu ortaya çıkarmıştır. İnsan mikrobiomu kavramı, özellikle bağırsak floramızın kompleks bir dış organ sistemi oluşturduğu düşünüldüğünde çok ilginç özelliklere sahiptir. Sağlığımızı, infeksiyonları önleyerek ve modifiye ederek doğrudan etkiler. Günümüzde *Clostridium difficile* kolitlerinde fekal transplantasyon gündeme gelmiştir. Mikrobiyomda meydana gelen varyasyonların belirli kronik hastalıklara, alerji ve malnütrisyona yol açtığı bilinmektedir. Bazı kronik hastalıklarda direkt ya da indirekt infeksiyöz temel gösterilmiştir: servikal, hepatik ve gastrik kanser gibi. Bazı hastalıkların patogenezinde koeneksiyonların ve beslenmenin yeri, kızamık ve A vitamini ilişkisinde olduğu gibi, gösterilmiştir. Çoğu yeni ortaya çıkan infeksiyonun, muhtemelen %60'ından fazlası hayvan orijinlidir. Bunun farkındalığı, sürveyans ve hastalığın patogenezinin anlaşılması ve kontrolü için gereklidir.

Eksozomlar, 30-100 nm büyüklüğünde biyolojik membran vezikülleridir. Çoğu hücreden salınan bu veziküller, tetraspanin, adhezyon molekülleri, lipit ve RNA içerirler. Genetik materyal transportu, bağışıklık sistemi modülasyonu ve hücreler arası ilişki gibi pek çok fonksiyonları vardır. Viruslara benzer yollarla hücrelere girdikleri bildirilmiştir. Bu özellikleri ile gen tedavisinde kullanılabilecekleri ve RNA içeren eksozomların, hastalıkların biyomarkırları olarak saptanabilecekleri gösterilmiştir. Gelişmekte olan nanotıpta tanı ve tedavide ikiz kullanımları 'teranostikler' olarak adlandırılmıştır⁽¹⁰⁾.

İnsan tükürüğünün proteomunun incelenmesi temelde tamamlanmıştır. Tükürük çok kolay elde edilen bir klinik örnektir. Tükürük protein ve peptidleri arasında, bazı hastalıklar için tanı markırları belirlenmiştir⁽¹¹⁾.

Klinik mikrobiyoloji laboratuvarında mikroorganizmaların hızlı tayini bakteri, virus, mantar, mikobakteri ve parazitlerin yol açtığı infeksiyonların optimal tedavisinde büyük önem taşımaktadır. Hızlı tanı, geniş spektrumlu tedavi yerine hedefe yönelik tedaviye olanak sağlar. Bu seçilen tedavi de, normal floranın harap edilmesine, toksik etkilere ve patojenlerin seçilimine engel olur. Yeni teknolojilerin geliş-

mine, özellikle tüm infeksiyonlar arasında en yüksek mortaliteye sahip kan akımı infeksiyonlarında gereksinim olduğu vurgulanmaktadır. Laboratuvar grubunun, kanıta dayalı girişimsel laboratuvar tıbbı ile klinik kullanıma uygun maliyet etkin yeni teknolojiler üretecek araştırma projelerinin kucaklaşmasını sağlaması gerektiği, 2011 yılında Houston’da yapılan ‘2015 yılında Klinik Mikrobiyoloji’ isimli oturumunda dile getirilmiştir. Kan kültüründe Gram boyama sonucunun bir saat içinde bildirilmesinin bile ölüm oranını % 17 düşürdüğü gösterilmiştir. Etkili antibiyotik tedavisinin zamanında başlanmasının yüksek düzeyde hayat kurtarıcı olduğunun bilinmesine rağmen; uzun süre 30-40 yıllık teknolojilere bağlı kalınmıştır. Ancak son yıllarda yeni teknolojiler; peptid nükleik asit floresan in situ hibridizasyon (PNA-FISH), hedefe yönelik eş-zamanlı PCR (GeneXpert assayler) kullanıma girmiştir. Bunları takiben çoklu çoğaltma ve geniş kapsamlı moleküler yöntemler, mikroarrayler, 16S rRNA geninden universal PCR’ı takiben dizileme yöntemleri ve yakın zamanlarda “mass spektrometre” esasına dayalı teknikler (PCR ile birlikte kullanılan elektrosprey ionizasyon-kütle spektrometresi (PCR/ESI-MS) ve “matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry” (MALDI-TOF MS) gündeme gelmiştir. Son derece duyarlı tekniklerin uygulanması için maliyeti yüksek cihaz ve yazılım paketlerine gereksinim, yaygın etkin kullanımlarını kısıtlayan özellikleridir. Bu yeni teknolojilerin ve uygulamalarının sonuçlarının etkinliğinin tayini için, kanıta dayalı girişimlere daha fazla zaman ayırarak farklı düşünmeye ve eğitmeye başlamaları gerekliliği üzerinde durulmaktadır. Çoklu ve geniş kapsamlı teknoloji platformlarının kullanılmasına başlanması ile birlikte ortaya çıkacak büyük miktardaki biyoinformatik verisinin nasıl kullanılacağı konusunun da gündeme geleceği ve bunu üstlenecek bir inisiyatifin ortaya çıkmasının ve bu konuların da eğitim programlarına girmesinin gerekliliği vurgulanmaktadır. En önemlisi yeni teknolojilerin, maliyet ve kompleks özellikleri göz önüne alındığında, bu durumda, sadece büyük referans ve üniversite laboratuvarlarında sınırlı kullanımda kalacakları aşıkardır. Bu moleküler ve protein temelli yeni

testlerin doğru sonuçlarını gösteren çalışmalar bu testlerin tercih edilir testler haline geleceğini göstermekte ancak yaygın kullanımları için güçlüklerin aşılması gerekliliği üzerinde durulmaktadır⁽³⁾.

Fosforodiamidat morfolino oligomerler (PMOs) ve sentetik “antisense” oligonükleotit analoglar spesifik RNAlar ile birleşip translasyonu etkileyebilmekte ve örneğin iki fulminan viral infeksiyonda (EBOLA ve Marburg) kanamalı ateşi olan hayvanlarda önleyebilmekte ve stabil kolay uygulanabilir yapıları ile diğer viral infeksiyonlarda umut vaat etmektedirler. Modern altyapısı olmayan lokalizasyonlara yeni ve yeniden ortaya çıkan infeksiyonların tedavisinde aday gözükmektedirler⁽¹²⁾. Yeni teknolojiler ile birlikte çok farklı sistemlerdeki genomlarda değişiklik yapmak mümkün hale gelmiştir. Bu gelişmelerin gen tedavisindeki yeri de incelenmektedir⁽⁸⁾. Son on yılda metagenomikler, özellikle viroloji alanında sayısız uygulamaları ile güçlü bir araç olmuştur. Konvansiyonel kültür ve sekansa dayalı tekniklerle saptanamayan yeni virusların tanısında çok büyük kolaylık sağlarlar⁽⁷⁾.

Hayatın çeşitliliği, polipeptid ve nükleik asit gibi doğal biyopolimerlerde kodlanabilen çok kapsamlı fonksiyon ve özelliklere dayanmaktadır. Çok kullanışlı olmalarına rağmen özellikle nükleik asitler söz konusu olduğunda kimyasal işlevsellikleri sınırlıdır. Nükleik asitlerin kimyasal modifikasyonu, fonksiyonel çeşitliliklerini inanılmaz derecede arttırabilir ancak bu polimerlerin oluşturulan tüm fenotipik potansiyellerine ulaşabilmek de bir replikasyon sistemini gerektirir. Kimyasal ve enzimatik sentezde, doğal olmayan nükleik asit polimerlerinin evolüsyonu ve replikasyonunda çok ilerlemeler kaydedilmiştir. Bu da doğada erişilemeyecek düzeyde geniş dizi sahası incelemesine olanak sağlayacak yeni bağlar, katalizörler ve materyal üretilmesi umudunu vermektedir. DNA ve RNA biyolojide genetik bilginin depolarıdır. Bilgi saklamaya ve replikasyona uygundur. Nükleik asitlerin üç boyutlu yapılarında alternatif nükleobazlar, belkemiği bağları ve ribofuronoz özel yapılar ile modifikasyon yapılabilir. Bu kimyasal yapılar sarmal oluşturabilir, bilgi saklayabilir ve evolüsyona uğrayabilir. İlk kez 2009 yılında

Herdewijn ve ark.⁽⁹⁾ tarafından önerilen terim XNA(xeno-nükleik asitler), bu tür sentetik genetik polimerlerin yapısında yer alır. Bu XNA'ların başarıyla replikasyonu için geliştirilen stratejilerdeki başarı da sentetik genetik olarak adlandırılan alanı oluşturmuştur.

Genetik ve protein komponentlerin identifikasyonunu sağlayan 'omiks çağı' "network" yapılarına detaylı bakışı sağlayan sistemler biyolojisi ile birleşerek, mühendislik prensiplerini kullanan yeni bir disiplinler arası bilim olan sentetik biyolojinin temelini oluşturmuştur. Moleküler ve bilişimsel biyoloji araçlarını tahmin edilebilir fonksiyonları olan standardize biyolojik komponentleri içeren kapsamlı bir katalogdan fonksiyonel tasarımcı araçları birleştirmede kullanan sentetik biyoloji, yaşayan sistemleri programlayan karmaşık kontrol dinamiklerini anlamamızda büyük katkı sağlamıştır. Bu şekilde son on yılda toplanan veriler, sentetik biyolojiden ilham alan yeni biyomedikal uygulamaları ortaya çıkarmıştır. Bu gelişmeler ilaç keşfinde, teknoloji üretiminde ve metabolik bozukluk ve infeksiyon hastalıklarının tedavi stratejilerinde yeni açılımlar kazandıracak niteliktedir. Çeşitli sentetik biyoloji kökenli stratejilerle örneğin sıtma ve vektörlerle bulaşan infeksiyonlarla mücadelede çok yeni bir yaklaşımla tedavi etme yerine vektörler hedeflenerek korucu strateji benimsenmiştir. Klasik anti-malarya stratejilerinde vektörün yaşam siklusunu hedefleyen önlemler, dirençli sivrisinek ve Plasmodium türlerine yol açmıştır. Yeni teknolojilerle letal genetik komponentleri vahşi-tip popülasyonda yayan transgenik vektörler yaratılmıştır. Bu çalışmalar, 'dengue' virusu taşıyıcısı sivrisineklerde de denenmiştir. Çoklu ilaç dirençli patojenlerin hızla arttığı dünyamızda, primer tedavi olarak antibiyotik tercihi giderek önemini kaybedecek gibi gözükmektedir. Yine son yıllarda sentetik biyoloji, bakteriyel patojenlerle baş etmek için yeni stratejiler geliştirmektedir. Bunlar arasında bakteriyel direnci ortadan kaldıracak yeni sentetik ilaçların tasarımı, biyofilm-leri harap edecek tasarımcı fajların oluşturulması, antibiyotiklerin indüklediği oksidatif stres direncinin kırılması ve patojenlerin virulans faktörlerini etkisiz kılacak probiyotik bakterilerin programlanması sayılabilir. Yaşayan sistemleri

yeniden programlama gücüne sahip sentetik biyoloji, insan sağlığında önemli bir yere sahip olacaktır. Henüz kliniklerde standart bir pratik uygulama olmamakla birlikte, sentetik biyologlar 21. yüzyılda sağlık hizmetinde çığır açabilecek tanı, korunma ve tedavi stratejilerini içeren etkileyici bir birikim oluşturmuş bulunmaktadırlar⁽⁵⁾.

Tıbbi bakıma, 'P4 tıbbı' diye adlandırılan 'predictive, preventive, personalized ve participatory' kelimelerinin baş harflerinin ele alınmasıyla oluşturulan P4 tıbbi yaklaşımı, kişi hastalanmadan hekimlerin erken uyarıları dikkate alarak önlem almalarını, kişilerin hastalanması için hastalığı önlemek amacı ile yaşam biçimlerini düzenleyebilmelerini sağlar. P4 tıbbi, sistemler yaklaşımını da birlikte getirmektedir. Kişisel genom dizi analizi ve çok çeşitli OMİKS'lerden (transkriptomiks, proteomiks, metabolomiks ve lipidomiks) yoğun miktarda verileri kullanarak oluşturulan dinamik hastalık tahmin "network"leri için yeni bilişimsel tekniklerle birlikte sistemler yaklaşımı P4 tıbbını destekler. P4 tıbbi yaklaşımının etkinliğinin en güzel örneği, kanser tedavisindeki değişimdir. Kanser tedavisinde erken tanıyı takiben genetik zemine göre en uygun tedaviyi uygulamak için hastanın genotiplenmesi buna bir örnektir. Kardiyovasküler hastalıklar belki hatta nörodejenaratif bozukluklar P4 tıbbi için yeni hedefler olabileceken; infeksiyon hastalıklarında P4 tıbbi henüz çok erken aşamalarda olsa da gelecekte hem hastalara hem de sağlık sistemine çok katkıda bulunacak gibi gözükmektedir⁽¹⁾.

Tıp uygulamaları giderek büyük değişikliklere uğramaktadır. 'P6 tıbbi' kavramı 'personalized, predictive, preventive, participatory, psychocognitive ve public' kelimelerinin baş harflerinden oluşmakta ve kişisel, tahmine dayalı, koruyucu, iştirakçi, psikokognitif ve toplumsal tıbbi tanımlamaktadır. Tıp kavramı, yıllar geçtikçe hekime odaklı P0 kavramından önce P3 ve P4 tıbbına sonrasında da P6 tıbbına gelişmiş; sadece hasta, hastalık ve hekim kavramından teknolojinin de ilerlemesiyle, son derece kompleks ve interdisipliner hale gelerek iştirakçi hasta odaklı olmuştur. Kişisel tıp ile hastanın spesifik moleküler yapısına göre tedavi ayarlamak mümkün olmaktadır⁽²⁾.

Günümüzde, 2002 yılında Michael ve ark.⁽⁴⁾ tarafından moleküler teknolojinin başarı ile kullanılması ile 2025 yılında gerçekleşeceğini düşünülen olanakların çoğunu bugün henüz 2025 yılına gelmeden başarı ile kullanmaktayız.

Artık gelinen noktada geleneksel mikrobiyoloji ile sistemler yaklaşımı ve yeni teknolojiler arasındaki uçurumu ortadan kaldırmaya yönelik toplantılar düzenlenmekte ve prokaryotik biyoloji, antibiyotik direnci, transkripsiyonel ve genetik ağlar, bakteriyel topluluklar, regülasyon, işaretleşme, hücre biyolojisi ve patogenez ele alınarak mikrobiyolojide araştırma alanında yeni yaklaşımlar yaratılmaya çalışılmaktadır. Bu çabanın neler getirdiğini sanırım bizler de görebileceğiz.

KAYNAKLAR

1. Bengoechea JA. Infection systems biology: from reactive to proactive (P4) medicine, *Int Microbiol* 2012;15(2):55-60. PMID:22847266
2. Bragazzi NL. From P0 to P6 medicine, a model of highly participatory, narrative, interactive, and "augmented" medicine: some considerations on Salvatore Iaconesi's clinical story, *Patient Preference and Adherence* 2013;7:353-9. <http://dx.doi.org/10.2147/PPA.S38578> PMID:23650443 PMCID:3640773
3. Donna W M, Michael DW. New technologies in clinical microbiology, *J Clin Microbiol* 2011;49(9):62-7. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00834-11> PMCID:3185853
4. Dunne WM, Pinckart JK, Hooper LV. Clinical microbiology in the year 2025, *J Clin Microbiol* 2002;40(11):3889-93. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.40.11.3889-3893.2002> PMID:12409347 PMCID:139721
5. Folcher M, Fussenegger M. Synthetic biology advancing clinical applications, *Curr Opin Chem Biol* 2012;16(3-4):345-54. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2012.06.008> PMID:22819494
6. Howitt P, Darzi A, Yang G et al. Technologies for global health, *Lancet* 2012;380(4):507-35. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61127-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61127-1)
7. Mokili JL, Rohwer F, Dutilh BE. Metagenomics and future perspectives in virus discovery, *Curr Opin Virol* 2012;2(1):63-77. <http://dx.doi.org/10.1016/j.coviro.2011.12.004> PMID:22440968
8. Perez-Pinera P, Ousterout DG, Gersbach CA. Advances in targeted genome editing, *Curr Opin Chem Biol* 2012;16(3-4):268-77.
9. Pinheiro VB, Holliger P. The XNA world: progress towards replication and evolution of synthetic genetic polymers, *Curr Opin Chem Biol* 2012;16(3-4):245-52.
10. Tan A, Rajadas J, Seifalian AM. Exosomes as nanotheranostic delivery platforms for gene therapy, *Adv Drug Deliv Rev* 2012;65(3):357-67. doi:10.1016/j.addr.2012.06.014 <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2012.06.014>
11. Ruhl S. The scientific exploration of saliva in the post-proteomic era: from database back to basic function, *Expert Rev Proteomics* 2012;9(1):85-96. <http://dx.doi.org/10.1586/epr.11.80> PMID:22292826 PMCID:3289089
12. Warren TK, Shurtleff AC, Bavari S. Advanced morpholino oligomers: a novel approach to antiviral therapy, *Antiviral Res* 2012;94(1):80-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2012.02.004> PMID:22353544